

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 04-207195

(43)Date of publication of application : 29.07.1992

(51)Int.Cl.

C12N 15/10

C12Q 1/68

C12Q 1/70

(21)Application number : 02-341083

(22)Date of filing : 30.11.1990

(71)Applicant : SHIMADZU CORP

(72)Inventor : SHIRASAKI YOSHINARI

YAMAGATA KOICHI

OHASHI TETSUO

TADA ATSUSHI

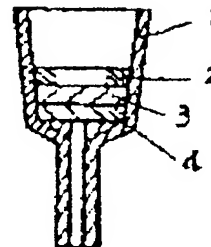
FUKUSHIMA SHIGERU

(54) METHOD FOR COLLECTING NUCLEIC ACID COMPONENT OF VIRUS AND METHOD FOR EXAMINING VIRUS

(57)Abstract:

PURPOSE: To collect the subject nucleic acid component used for examining virus by adding a virus-adsorbing resin to a suspension containing the virus to catch the virus on the resin, separating the resin on filter media and subsequently passing a virus-dissolving solvent through the separated resin to recover a solution containing the nucleic acid component of the virus.

CONSTITUTION: When the nucleic acid component of a virus is collected from a suspension containing the virus, a virus-adsorbing resin is added to the suspension to catch the virus on the resin, and the virus-containing resin is supplied on filter media 3, 4 of a filter unit 1 to separate the resin. A virus-dissolving solvent is passed through the virus-containing resin separated on the filter media 3, 4 to prepare a solution containing the nucleic acid component. A desired virus DNA is multiplied directly or through the reaction of a reverse transcriptase from the solution containing the nucleic acid component of the virus by a PCR method, and the virus is examined using the multiplied DNA.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

⑫ 公開特許公報(A)

平4-207195

⑤ Int. Cl.⁹

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 平成4年(1992)7月29日

C 12 N 15/10
C 12 Q 1/68

A

6807-4B
8717-4B

C 12 N 15/00

A*

審査請求 未請求 請求項の数 2 (全5頁)

⑭ 発明の名称 ウイルスの核酸成分採取方法及びウイルス検査法

⑮ 特 願 平2-341083

⑯ 出 願 平2(1990)11月30日

⑰ 発 明 者 白 崎 良 成 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株式会社島津製
作所三条工場内

⑱ 発 明 者 山 形 浩 一 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株式会社島津製
作所三条工場内

⑲ 発 明 者 大 橋 鉄 雄 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株式会社島津製
作所三条工場内

⑳ 発 明 者 多 田 淳 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株式会社島津製
作所三条工場内

㉑ 出 願 人 株式会社島津製作所 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地

㉒ 代 理 人 弁理士 武石 靖彦 外2名

最終頁に続く

明 細 書

1 発明の名称

ウイルスの核酸成分採取方法及びウイルス検査
法

2 特許請求の範囲

(1) ウイルスを含む懸濁液からウイルスの核酸成
分を採取する方法であって、

前記懸濁液中にウイルス吸着樹脂を加えてウイ
ルスを樹脂上に捕捉することと、

前記ウイルスを捕捉した樹脂をフィルター上に
分離することと、

前記フィルター上に分離したウイルス捕捉樹脂
にウイルス溶解剤を流通させて、ウイルスの核酸
成分を含む液を得ることと

を含むウイルスの核酸成分採取方法、

(2) 請求項1の方法で得られたウイルスの核酸成
分を含む液を直形又は逆転写酵素の反応を介した
後PCR法に付して、所望のウイルスのDNAを
増幅することと、

前記増幅したDNAを用いて、前記懸濁液中の
所望のDNAウイルスの有無を検査することと
を含むウイルス検査法

3. 発明の詳細な説明

<産業上の利用分野>

本発明は、ウイルスを含む懸濁液からウイルス
の核酸成分を採取する方法及びその方法を用いた
ウイルス検査法に関する。

<従来の技術>

(ウイルスの核酸成分の採取) 通常のウイルス
の核酸成分採取法では、ウイルスを含む機体を溶
液中でプロテナーゼKのような酵素、あるいはド
デシル硫酸ナトリウムのような界面活性剤、ある
いは水酸化ナトリウムのようなアルカリを用いて
溶解させたり、超音波、凍結融解、あるいはミル
のような物理的破壊方法でウイルスを含んだ細胞
とウイルスを破壊したりすることでまず粗精製品
を得る。その後、フェノール・クロロホルム抽出、
エタノール沈殿処理を施しDNAの精製品を得る。
(ウイルス検査) また従来のウイルス同定につ

いて、直接的に病原微生物を検出する方法としては、①病的ウイルスの生育し易い培養細胞に、なるべく無菌的に検体から回収したウイルスを感染させ、細胞病変効果 (cytopathic effect, CPE) またはプラックを検出する組織培養法、②乳呑みマウスなどの動物に検体から回収したウイルスを感染させ、臨床変化を検出する動物接種試験法、③ふ化鶏卵に検体から回収したウイルスを接種して病変効果を検出するふ化鶏卵接種法、④あるいはウイルスに固有の抗体をラテックスビーズに固定しこれを前記試料中に添加しビーズ表面の抗体が菌体を認識することによりビーズが凝集することを利用するラテックス凝集法、⑤ポリエチレン製プレートビーズに1次抗体を結合させこれにウイルスを作用させ抗原-抗体反応により結合するものとし、これをより分けさらに酵素や蛍光物質により標識された2次抗体を作用させB/F分離後酵素活性や蛍光強度を測定することで同定するサンドイッチ抗体法、⑥ウイルスの核酸成分をメンブランフィルターに転写し特異的なDNA断片

に酵素や放射活性物質などを標識したDNAプローブを作用させて遺伝子レベルで検出するDNAプローブ法がある。この方法はコロニー中のDNA中にDNAプローブと相補的な塩基配列があると両者の間に水素結合が生じることを利用して目的のウイルス等を検出する方法である。

直接的に病原微生物を検出しないう方法としては、感染直接と感染から数週間後に患者または感染動物から採血し、血清中の抗体値の増減をみる方法が一般に行われている。

<発明が解決しようとする課題>

前記従来の方法ではCPE、またはプラックを検出するのに、一週間以上の培養を必要とし、一般産科細胞においては、65から75%の血清型のウイルスしか成育できないことから、あまり有用とは言えない。乳呑みマウスに接種する方法の場合は、その他多くの血清型のウイルスを増殖させることができるが、時間がかかり、手間がかかることから、必ずしも広く利用されていないのが実状である。

免疫学的検定法や、血清学的技術も、血清形間に抗原的多用性があることから、十分なものとは言えない。

核酸ハイブリダイゼーションを行うアプローチは、たくさんの異なった血清形のウイルスを識別することができ、組織培養法に比べてはるかに短時間で検出できるので、きわめて将来性がある。しかし、検体からのウイルスの核酸の抽出方法が煩雑なため、まだ広く使われるには至っていない。

本発明の第一の目的は、自動化が可能で迅速かつ簡便に試料懸濁液からウイルスの核酸成分を得ることができる方法を提供することにある。本発明の第二の目的は、前述の方法を用いて簡便に同定し得るウイルス検査方法を提供することにある。

<課題を解決するための手段>

(1) 第1の発明に係るウイルスの核酸成分採取方法は、ウイルスを含む懸濁液からウイルスの核酸成分を採取する方法である。

この方法は、懸濁液中にウイルス吸着樹脂を加えてウイルスを樹脂上に捕捉することと、

フィルターによって前記樹脂をフィルター上に分離することと、

前記フィルターにウイルス溶解剤を流通させて、ウイルスの核酸成分を含む液を得ることと、
を含んでいる。

(2) 第2の発明に係るウイルス検査方法は、第1の発明による方法で得られたウイルスの核酸成分を含む液を、PCR法 (Polymerase Chain Reaction 法) に付して、所望のウイルスのDNAを増幅することと、

前記増幅したDNAを用いて、前記懸濁液中の所望のDNAウイルスの有無を検査することと、
を含んでいる。

なお、第2の発明には、第1の方法で得られたRNAウイルスの核酸成分を含む液を逆転写酵素の反応に付してコンプリメンタリーDNAを作製することと、

前記DNAをPCR法に付して、所望のウイルスのRNAのコンプリメンタリーDNAを増幅することと、

前記増幅したDNAを用いて、前記懸濁液中の所望のRNAウイルスの有無を検査することと、を含んでいる。

<作用>

(1)第1の発明に係るウイルスの核酸成分採取方法では、ウイルス吸着樹脂を用いることで、ウイルス粒子よりはるかに大きな粒子としてウイルスを扱うことが出来るので、操作がしやすく、自動化が可能で迅速かつ簡便に試料懸濁液からウイルスの核酸成分を得ることができる。

(2)第2の発明に係るウイルス検査方法では、第1の発明に係る迅速かつ簡便なウイルスの核酸成分採取方法を採用しているため、ウイルス検査全体としても迅速かつ簡便なものとなる。

<実施例>

まず、本発明に係るウイルスの核酸成分採取方法の一例を説明する。なお、第1図に本発明の作業工程を示す。

(試料液の調製：ステップ1)

ウシ胎児血清1mlに、センダイウイルス(林原

200μl)を吸引し、フィルターユニット内に流通させた。

(核酸成分の沈澱：ステップ8~10)

さらに400μlのエタノールと20μlの3M酢酸ナトリウム水溶液の混液420μlを0℃にて前記シリッジに吸引し、これを排出して、フィルター上に核酸成分を沈澱の状態で担持した。次いで1mlの70%エタノール(0℃)の吸引・排出、1mlの90%エタノールの吸引・排出により、この核酸成分の沈澱物を洗浄した。

(核酸成分の溶出：ステップ11)

次いで0.5%Tween20、0.5%Nonidet P-40水溶液100μlを前記シリッジに吸引し、フィルターユニット内に流通させ、60℃で10分間インキュベート後この液を排出して核酸成分の溶液を得た。

(逆転写反応及びコンプライメンタリーDNAの増幅：ステップ12)

上記溶出液を3μl取り、RNAの特定の領域について相補的なDNAを合成する逆転写反応と、

生物化学研究所製)10⁴倍を懸濁させ、試料液を得た。

(吸着処理：ステップ2、3)

予め水洗したウイルス吸着樹脂PB-100(花王製)10mgを試料液に加え、これについてシリッジ(1ml用、図示せず)で吸引、排出を数回繰り返してウイルス粒子を樹脂に吸着させた。

(ウイルス粒子の洗浄：ステップ4~6)

吸着処理後、試料液を前記シリッジ内に全量吸い上げた後、シリッジの先端に第2図に示すフィルターユニットを装填し、試料液を排出し、フィルター上に樹脂を担持させた。なお、第2図中、1はフィルターユニットのボディ、2はフィルターを抑えるパッキン、3はガラス繊維ろ紙GF/B(ワットマン社製)、4はガラス繊維ろ紙GF/F(同社製)である。純水1mlをこのシリッジで吸引、排出し(2度)、ウイルス粒子に付いた血清成分を洗い落とした。

(ウイルス粒子の溶解：ステップ7)

前記シリッジに界面活性剤(1%SDS水溶液

特異的に目的DNAを増幅する方法であるPCR法(Saiki,R.K.et al, Science 239 487-491 (1988))を行った。

すなわち、蒸留水12.2μl、プライマー2.5μl(20μM)2種、dNTP4.8μl(1.25mM各dNTP)、リバーストランスクリプター0.5μl(200ユニット/ml;BRL製)、RNasin1μl(40ユニット/ml;TOYOBO製)、0.5%Nonidet P-40、0.5%Tween20水溶液3μl、10倍緩衝液3μl(パーキンエルマーシータス社製)、Taqポリメラーゼ1.5ユニット(同社製)、の合計30μlにミネラル油50μlを蒸発防止剤として重層して、DNA Thermal Cycler(同社製)にセットした、ここで言うプライマーとは、20塩基対のオリゴヌクレオチドである。また、ここで言う10倍緩衝液とは100mMトリス塩酸緩衝液(pH9.0)、500mMKCl、15mM MgCl₂である。

逆転写反応の条件は42℃40分、PCR反応の温度サイクルは変性94℃1分、アニーリング50℃1分、延長伸長72℃1分、1サイクル5.7分、42

サイクルで行った。

(検出)

上記PCR後の溶液を10μlとり、エチジウムブロマイドを含む2%アガロースゲルで100V35分間電気泳動を行った後、トランスイルミネーター上にゲルをおき、波長320nmのUV光を照射したところPCR反応で増幅したDNAは蛍光を発した。その蛍光をインスタントフィルムを装着したカメラにて撮影した結果を第3図に示した。センダイウイルスがサンプル中に含まれている懸濁液について本発明による方法を実施した後の電気泳動パターンを第3図のレーン1に示す。その結果、予想される173塩基対の位置にバンドが出現した。これは同時に電気泳動したポジティブコントロールサンプル(第3図のレーン3)と同じ位置であることからセンダイウイルスを特異的に検出できたことがわかる。ここで言うポジティブコントロールとはセンダイウイルスを界面活性剤で溶解した後、フェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈澱を施して得たDNA溶液を用

いたものである。

なお、レーン2は故意にウイルスを入れずに血清だけを試料瓶と同様に処理したパターン、レーン4は溶出液を入れずにPCR法を行ったもの、MはφX174 DNAを制限酵素HincIIで完全消化して得られた分子番号マーカであり、A、B、C、D、Eは対応する塩基対の数である。

上記結果から、この発明のウイルスの検出成分採取法およびウイルス検出法によれば、血清中のセンダイウイルスを上記方法により簡便かつ5時間程度という短時間で検出できることがわかった。〈発明の効果〉

第1の発明によれば、ウイルス吸着樹脂を採用したので、ウイルスの取扱が容易になり、ウイルスの検出成分の抽出の自動化が可能となり、迅速かつ簡便に操作が行えるようになる。

第2の発明によれば、第1の発明を用いてDNAウイルスの検出成分を得、PCR反応を施すので、第1の発明と同様に簡便かつ迅速にDNAウイルスを検査することができる。

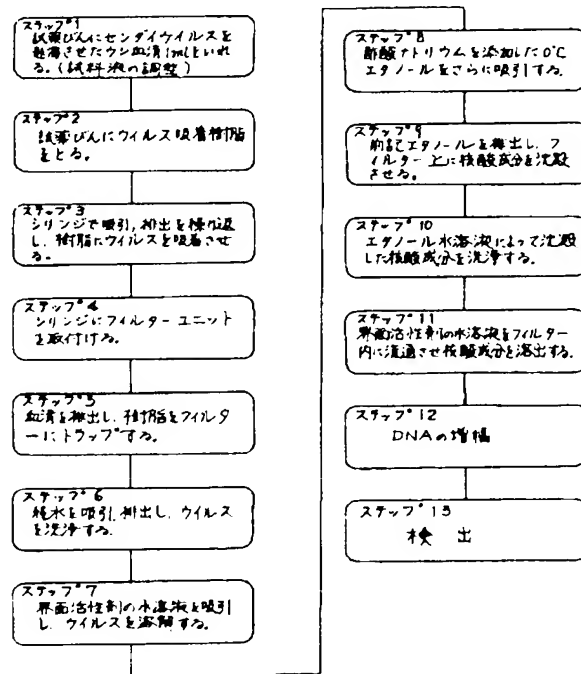
更に、第1の発明を用いてRNAウイルスの検出成分を得、逆転写反応及びPCR反応を施すので、第1の発明と同様に簡便かつ迅速にRNAウイルスを検査することができる。

4. 図面の簡単な説明

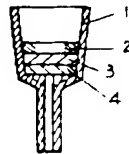
第1図は本発明の一実施例の作業行程を示すフローチャート、第2図はフィルターユニットの構造を示すもの、第3図はこの発明の方法を実施した後の電気泳動パターンである。

特許出人 株式会社 島 津 製作 所

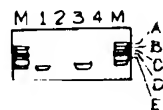
代理人 弁護士 武 石 南 彦
(外2名)



第1図



第2図



A... 1,057bp
B.....770
C.....612
D.....495
E.....350

第3図

第1頁の続き

⑤Int. Cl.⁵

C 12 Q 1/70

識別記号

庁内整理番号

6807-4B

⑦発 明 者 福 島

繁

京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株式会社島津製
作所三条工場内